GenoType Enterococcus

VER 1.0

CE

IFU-888-03

03/2009

HAIN LIFESCIENCE

GenoType **Enterococcus**
Test Génétique d'Identification des Enterococci Résistants à la Vancomycine

Principe

Le test **GenoType Enterococcus** est basé sur la technologie **DNA•STRIP** et permet l'identification combinée des espèces enterococcales *E. faecalis, E. faecium, E. casseliflavus* et *E. gallinarum* ainsi que des gènes de résistance à la vancomycine *vanA, vanB, vanC1* et *vanC2/C3*.

La procédure complète comporte trois phases : extraction de l'ADN à partir de cultures (bactéries fraîchement cultivées en milieu solide ; matériel requis pour l'extraction de l'ADN non fourni), une amplification multiplex à l'aide d'amorces biotinylées (ADN polymérase thermostable non fournie), et hybridation inverse.

Cette dernière phase comporte les étapes suivantes : dénaturation chimique de l'ADN amplifié, hybridation des amplicons simples brins biotinylés aux sondes pré-immobilisées sur la membrane, lavage stringent, et enfin addition d'un conjugué streptavidine/phosphatase alcaline suivie d'une révélation chromogénique. Les signaux obtenus sont facilement et rapidement interprétés à l'aide d'une matrice fournie avec chaque kit.

Conservation et Précautions

Dès réception, conserver le Mélange Amorces/Nucléotides (PNM) à 2-8°C et isolés de toute source d'ADN potentiellement contaminante. Si la durée de conservation doit excéder 4 semaines, conserver à –20°C. Il est recommandé d'aliquoter le PNM afin d'éviter les congélations/décongélations répétées. Conserver tous les autres composants du kit à 2-8°C. Ne pas utiliser les réactifs au-delà de leur date de péremption.

Les échantillons, prélevés sur patient ou à partir de culture doivent toujours être considérés comme potentiellement infectieux. Les échantillons et les cultures provenant de patients à risque doivent toujours être étiquetés et manipulés dans des conditions de sécurité adaptées. Suivre les recommandations (fédérale, nationale, locale) d'hygiène, de sécurité et d'environnement. Se protéger à l'aide de vêtements adéquats et de gants.

Observer les précautions usuelles pour la préparation de l'amplification. Il est essentiel que le matériel et les réactifs utilisés pour l'extraction de l'ADN et pour la préparation de l'amplification soient exempts de DNases.

Lors de la manipulation du kit, tenir compte des indications de sécurité suivantes :
La **Solution de Dénaturation** (DEN) contient du NaOH (<2%) et est irritante pour la peau et les yeux (R 36/38 et S 26-37/39-45).
Le **Substrat Concentré** (SUB-C) contient du Dimethyl Sulfoxide et est irritante (R 36/37/38, S 23-26-36).
Pour des informations supplémentaires, consulter les fiches de sécurité, qui peuvent également être téléchargées à l'adresse suivante :
www.hain-lifescience.com/products/msds.html

Contrôle de Qualité

Afin de contrôler le bon déroulement du test et le bon fonctionnement des réactifs, chaque bandelette comporte 2 zones de contrôle :

- une zone de Contrôle Conjugué pour contrôler la fixation du conjugué sur la bandelette et le bon déroulement de la révélation chromogénique
- une zone de Contrôle Universel qui détecte, au vue des connaissances actuelles, toutes les espèces bactériennes

Extraction de l'ADN

Le matériel de départ conseillé pour l'extraction de l'ADN consiste en des bactéries fraîchement cultivées en milieu solide. L'espace de travail doit être exempt de toute trace d'ADN amplifié. Toutes les procédures d'extraction de l'ADN à partir de bactéries et produisant de l'ADN capable d'être amplifié peuvent être employées. Le protocole d'extraction rapide décrit ci-après permet de préparer l'ADN en vue d'une amplification :

1. Prélever jusqu'à 5 colonies à l'aide d'une oeuse et resuspendre dans 150 µl d'eau.
2. Incuber la suspension bactérienne à 95°C pendant 10 minutes.
3. Incuber dans un bain à ultrasons pendant 15 minutes.
4. Centrifuger pendant 5 minutes à vitesse maximale et utiliser directement 5 µl de surnageant pour la PCR. Si l'ADN doit être conservé pendant une longue période, transférer le surnageant dans un nouveau tube.

Amplification

Préparer le mélange réactionnel (45 µl) dans une pièce exempte d'ADN. L'ADN de l'échantillon doit être rajouté dans une pièce séparée.

Préparer le mélange suivant par tube :

- 35 µl de PNM – fournie avec le kit
- 5 µl de tampon d'incubation de la polymérase 10x – non fourni
- x µl de $MgCl_2$[1)] – non fourni
- 1-2 unité(s) d'ADN polymérase thermostable (se référer au manuel) – non fourni
- y µl d'eau qsp 45 µl (hors volume de l'enzyme) – non fourni
- Ajouter 5 µl de solution d'ADN fraîchement extrait (20-100 ng d'ADN) pour atteindre un volume final de 50 µl (hors volume de l'enzyme).

1) Selon le système tampon/enzyme utilisé, la concentration optimale de $MgCl_2$ peut varier de 1,5 à 2,5 mM. A noter que certains tampons contiennent déjà le $MgCl_2$.

L'évaluation des performances du test **GenoType Enterococcus** a été réalisée avec la HotStarTaq DNA Polymerase (Qiagen). Lors de l'utilisation de cette enzyme, les volumes/réaction sont les suivants :

- 35 µl de PNM – fournie avec le kit
- 5 µl de tampon de PCR 10x pour HotStarTaq (contient 15 mM $MgCl_2$) – non fourni
- 2 µl 25 mM de $MgCl_2$ – non fourni
- 0,2 µl (1 U) HotStarTaq – non fourni
- 3 µl d'eau (niveau de pureté pour Biologie Moléculaire) – non fourni
- 5 µl de solution d'ADN (ajouté dans une pièce séparée)

La concentration finale du mix réactionnel en $MgCl_2$ est 2,5 mM.

Déterminer le nombre d'échantillons à amplifier (nombre d'échantillons à analyser + contrôles). Pour un contrôle de contamination, par exemple, la solution d'ADN à amplifier est remplacée par 5 µl d'eau. Préparer une solution mère de mélange réactionnel contenant tous les réactifs à l'exception de l'ADN, et bien homogénéiser (ne pas vortexer).
Aliquoter 45 µl du mélange réactionnel dans les tubes de PCR.

Profil d'amplification[2] :

15 min	95°C	1 cycle
30 sec	95°C	10 cycles
2 min	58°C	
25 sec	95°C	20 cycles
40 sec	53°C	
40 sec	70°C	
8 min	70°C	1 cycle

[2] S'applique à Taq polymérase utilisée au cours de la validation. En cas d'utilisation d'autres Taq polymérases de type « hot start », la durée de la première étape devra peut-être être raccourcie en cas d'utilisation d'ADN (se référer au manuel de l'enzyme).

Les produits de l'amplification peuvent être conservés entre +4 et –20°C.
La réaction d'amplification peut être contrôlée par électrophorèse en gel en déposant directement 5 µl de chaque échantillon (sans aucun tampon additionnel). Les amplicons ont une taille de 63 pb (fragment Contrôle Universel), 248 pb *(Enterococcus ssp.)*, 110 pb *(vanA)*, 51 pb *(vanB ; vanC2/C3)* et 76 pb *(vanC1)*.

Hybridation

Préparation

Préchauffer le bain-marie agitateur/**TwinCubator** à **45°C** (dérivation maximum : +/–1°C). Préchauffer les solutions HYB et STR à 37-45°C avant utilisation. Les réactifs ne doivent présenter aucun précipité (à noter cependant que la solution CON-D est opaque). Si besoin, agiter. Equilibrer les autres réactifs (à l'exception des solutions CON-C et SUB-C) à température ambiante. Dans un tube approprié, diluer le Conjugué Concentré (CON-C, orange) et le Substrat Concentré (SUB-C, jaune) au 1:100 dans un volume adéquat du tampon correspondant **(CON-C avec CON-D, SUB- C avec SUB-D)**. Bien homogénéiser et équilibrer à température ambiante. Pour chaque échantillon testé, ajouter 10 µl de concentré à 1 ml de tampon. Diluer CON-C avant chaque utilisation. Une fois dilué, SUB-C reste stable pendant 4 semaines conservé à température ambiante et à l'obscurité.

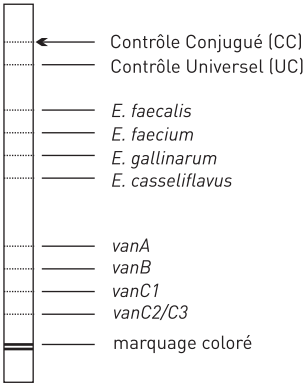
1. **Déposer 20 µl de Solution de Dénaturation (DEN, bleu) à une extrémité de chaque puits utilisé.**
2. **Ajouter 20 µl d'échantillon amplifié et mélanger les deux solutions par pipetages répétés. Incuber 5 minutes à température ambiante.**
   Pendant ce temps, à l'aide d'une pince, sortir du tube le nombre approprié de bandelettes (STRIPS), et inscrire au crayon leur numéro d'identification dans l'espace situé sous le marquage coloré. Toujours porter des gants pour manipuler les bandelettes.
3. **Ajouter dans chaque puits 1 ml de Tampon d'Hybridation (HYB, vert) préchauffé et homogénéisé. Doucement agiter le bac jusqu'à ce que le mélange devienne une coloration homogène.**
   Eviter les éclaboussures vers les autres puits.
4. **Déposer une bandelette dans chaque puits utilisé.**
   Les bandelettes doivent être entièrement recouvertes par le liquide, avec la face sensibilisée (identifiable par le marquage coloré) tournée vers le haut. Les bandelettes mal orientées doivent être remises en position à l'aide de pincettes propres. Afin d'éviter toute contamination, bien nettoyer les pincettes après chaque utilisation. Cela vaut aussi pour toutes les étapes suivantes.
5. **Placer le bac dans bain-marie agitateur/Twin**Cubator **et incuber 30 minutes à 45°C.**
   Pour le bain-marie agitateur sélectionner une fréquence d'agitation suffisante pour assurer un bon brassage du tampon. Ajuster le niveau de l'eau dans le bain-

marie agitateur au moins à un tiers de la hauteur du bac de façon à assurer un bon transfert de chaleur. Cela vaut aussi pour toutes les étapes suivantes.

6. **Aspirer le Tampon d'Hybridation.**
   Utiliser par exemple une pipette pasteur reliée à une pompe à vide.
7. **Ajouter à chaque puits 1 ml de Solution de Lavage Stringent (STR, rouge) et incuber 15 minutes à 45°C dans le bain-marie agitateur/Twin**Cubator.
8. **À partir de cette étape, travailler à température ambiante.**
   Eliminer la Solution de Lavage Stringent.
   Vider la Solution de Lavage Stringent dans un container à déchets. Eliminer tout le liquide résiduel en retournant le bac sur du papier absorbant (effectuer de même pour les autres étapes de lavage).
9. **Laver chaque puits avec 1 ml de Solution de Rinçage (RIN) et incuber pendant 1 minute sous agitation (Twin**Cubator**/plateau agitateur). Vider la Solution de Rinçage.**
10. **Ajouter à chaque puits 1 ml de Conjugué dilué (voir ci-dessus) et incuber 30 minutes sous agitation (Twin**Cubator**/plateau agitateur).**
11. **Vider le contenu des puits et rincer sous agitation 1 minute à l'aide de 1 ml de Solution de Rinçage (RIN). Vider RIN. Répéter ce rinçage une nouvelle fois, puis rincer une fois avec environ 1 ml d'eau distillée à l'aide d'une pissette.**
    Bien éliminer toute trace d'eau dans les puits après cette dernière étape.
12. **Ajouter 1 ml de Substrat dilué (voir ci-dessus) dans chaque puits et incuber sans agitation à l'obscurité.**
    Le temps de révélation peut varier en fonction des conditions de déroulement du test (de 3 à 20 minutes), notamment de la température de la pièce. Des temps de révélation trop longs peuvent entraîner un bruit de fond qui peut gêner l'interprétation des résultats.
13. **Arrêter la réaction en rinçant brièvement deux fois à l'eau distillée.**
14. **À l'aide de pincettes, récupérer les bandelettes et les sécher entre deux couches de papier absorbant.**

Évaluation et Interprétation des Résultats

Classer et ranger les bandelettes à l'abri de la lumière. Une feuille d'évaluation est fournie avec le kit. La matrice fournie avec le kit permet d'identifier chaque zone réactionnelle en alignant la bande CC de bandelette et de la matrice. Chaque bandelette comprend 10 zones réactionnelles (voir figure).



Remarque : Cette bandelette n'est pas représentée dans sa taille originale.

Contrôle Conjugué (CC)

Une ligne colorée doit se développer dans cette zone. Cette ligne témoigne de la bonne fixation du conjugué et du bon déroulement de la révélation.

Contrôle Universel (UC)

Cette zone comprend une sonde s'hybridant au niveau d'une région d'ADN hautement conservée au sein de toutes les espèces bactériennes testées à ce jour. Le développement d'une ligne colorée dans cette zone indique la présence d'ADN bactérien dans l'échantillon testé ainsi qu'une extraction et une amplification de l'ADN correctes. Puisque l'échantillon de départ étant une culture bactérienne, cette zone devrait développer un signal positif. L'amplification du contrôle peut néanmoins être atténuer par l'amplification du (des) séquence(s) spécifique(s).

A noter que le Contrôle Universel n'est pas un contrôle de PCR puisqu'un échantillon de contrôle de contamination (eau) entraînera un signal négatif dans cette zone.

Autres bandes
Sondes spécifiques ; utiliser la figure ou la matrice pour l'évaluation des résultats. Lorsqu'aucune autre bande ne développe de signaux positifs, les zones de contrôle doivent développer un signal positif. Si cela n'est pas le cas, il s'agit d'une réaction faussement négative, et le test doit être répété.
A noter que *E. flavescens* peut également réagir au niveau de la zone *E. casseliflavus*.

Toutes les lignes d'une même bandelette peuvent ne pas présenter la même intensité.

Limitations

En vue de l'amplification, l'ADN doit être extrait à partir de culture de bactéries à l'aide d'une méthode appropriée. L'ADN cible doit avoir été amplifiée efficacement pendant la réaction d'amplification.
Le test fonctionne dans les limites de la région du génome choisie pour les amorces et les sondes. Un séquençage potentiel doit être réalisés séparément.
La présence de différentes espèces bactériennes dans un même échantillon peut entravée l'interprétation du test.
Comme dans tout système de détection basé sur l'hybridation, il existe la possibilité que des variations situées dans la séquence d'ADN génomique cible à partir de laquelle les amorces et les sondes ont été choisies et pour lesquelles le test n'a pas été conçu, entraînent un résultat erroné. En raison de l'extrême variabilité des génomes bactériens, il est possible que certains sous-types puissent ne pas être détectés. Le test reflète l'état actuel des connaissances de la société Hain Lifescience.
L'utilisation de ce kit est réservée à un personnel qualifié déjà formé et rodé aux techniques de biologie moléculaire.
L'évaluation des performances du test a été réalisée à l'aide de la Taq polymérase HotStarTaq fournie par la société Qiagen (Hilden, Allemagne). Il reste à la charge de l'utilisateur de valider ce test en cas d'utilisation d'autres polymérases que ceux mentionnés ci-dessus.
Les données sur les performances du test peuvent être téléchargées sur le site internet : www.hain-lifescience.com

Causes d'Erreurs

Résultats faibles ou absence de signal (incluant la zone de Contrôle Conjugué)

- Température ambiante trop basse ou réactifs mal équilibrés.
- CON-C et/ou SUB-C n'a pas été ajouté ou était utilisé trop dilué.

Résultats faibles ou absence de signal, excepté dans la zone de Contrôle Conjugué

- La qualité et/ou la quantité de l'ADN extrait n'ont pas permis une amplification correcte. Analyser l'ADN amplifié sur un gel. Si aucun amplicon n'est visible, répéter les étapes d'extraction et d'amplification. Essayer éventuellement une autre méthode d'extraction de l'ADN. A noter que la réaction d'amplification peut être inhibé par un échantillon de départ trop concentré.
- Température d'incubation trop élevée.

Coloration non homogène

- Les bandelettes n'ont pas été suffisamment immergées lors des différentes incubations.
- Le bac n'a pas été correctement agité.

Bruit de fond important

- CON-C et/ou SUB-C utilisé(s) trop concentré(s).
- Les étapes de lavage n'ont pas été correctement effectuées.
- Les solutions de lavage étaient trop froides lors de leur utilisation.

Résultat inattendu

- Température d'incubation trop basse.
- Solution d'Hybridation et/ou Solution de Lavage Stringent incorrectement équilibrés ou homogénéisés.
- Contamination de l'ADN extrait et/ou des réactifs d'amplification avec de l'ADN précédemment extrait ou amplifié. Lorsque les réactifs d'amplification sont contaminés, un échantillon de contrôle négatif entraîne également le développement des lignes tests.
- Contamination des puits voisins par des éclaboussures lors de l'addition de la Solution d'Hybridation.

- Dans certaines conditions du test, une forte concentration d'ADN amplifié peut entraîner une réaction chromogénique très rapide. En pareil cas, afin de prévenir le développement de bandes dues à des réactions d'hybridation croisées, arrêter la réaction chromogénique dès que les premières lignes colorées deviennent visibles.
- La culture de départ n'est pas pure.

Matériel Requis mais Non Fourni

- ADN polymérase thermostable avec tampon (enzyme de type «hot start» recommandée, taux d'extension : (2-4 kb/min à 72°C, demi-vie : 10 min à 97°C, 60 min à 94°C, rendement d'amplification : $>10^5$)
- Bain à ultrasons
- Bain-marie agitateur/**TwinCubator**
- Chronomètre
- Eau (niveau de pureté pour Biologie Moléculaire)
- Embouts de pipettes stériles avec filtre
- Eprouvette graduée
- Gants à usage unique
- Microtubes pour thermocycleur; exempt de contamination par DNase et RNase
- Papier absorbant
- Pincettes
- Pipettes réglables pour 10, 20, 200, et 1000 µl
- Plateau agitateur/**TwinCubator**
- Réactifs pour l'extraction de l'ADN ainsi que les appareils associés
- Thermocycleur (taux de chauffage : 3°C/sec, taux de refroidissement : 2°C/sec, précision : +/–0,2°C)
- Thermomètre calibré

Composition du Kit

	Quantité	
Bandelettes sensibilisées avec les sondes spécifiques (STRIPS)	12	96
Mélange de Amorces/Nucléotides (PNM) contient amorces spécifiques, nucléotides, colorant	0,5 ml	4 ml
Solution de Dénaturation (DEN) ***prêt à l'emploi*** contient <2% NaOH, colorant	0,3 ml	2,4 ml
Solution d'Hybridation (HYB) ***prêt à l'emploi*** contient 8-10% de détergent anionique, colorant	20 ml	120 ml
Solution de Lavage Stringent (STR) ***prêt à l'emploi*** contient >25% d'un sel d'ammonium quaternaire, <1% détergent anionique, colorant	20 ml	120 ml
Solution de Rinçage (RIN) ***prêt à l'emploi*** contient du tampon, <1% NaCl, <1% de détergent anionique	50 ml	360 ml
Conjugué Concentré (CON-C) ***concentré*** contient de la phosphatase alcaline conjugué à la streptavidine, colorant	0,2 ml	1,2 ml
Tampon Conjugué (CON-D) contient du tampon, 1% agent bloquant, <1% NaCl	20 ml	120 ml
Substrat Concentré (SUB-C) ***concentré*** contient du Dimethyl Sulfoxide, solution substrat	0,2 ml	1,2 ml
Tampon Substrat (SUB-D) contient du tampon, <1% $MgCl_2$, <1% NaCl	20 ml	120 ml
bac, feuille d'évaluation	1 de chaque	4 de chaque
manuel d'utilisation, matrice	1 de chaque	1 de chaque

888-03-03-00

Hain Lifescience GmbH
Hardwiesenstraße 1, 72147 Nehren, Germany
http://www.hain-lifescience.de

REF **888** **12** **88896** **96**